

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-124780

(43)Date of publication of application : 11.05.2001

(51)Int.CI.

G01N 33/92
 C12N 9/02
 C12N 9/04
 C12N 9/16
 C12Q 1/26
 C12Q 1/28
 C12Q 1/32
 C12Q 1/46
 C12Q 1/60

(21)Application number : 11-307329

(71)Applicant : SHOWA DENKO KK

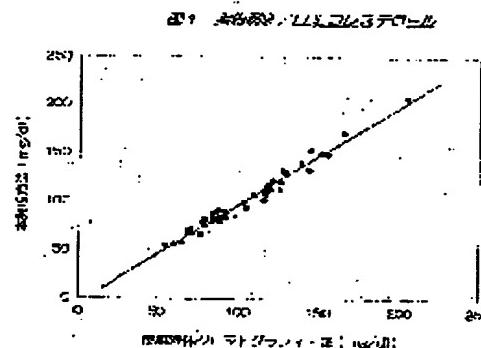
(22)Date of filing : 28.10.1999

(72)Inventor : SAWAYANAGI TOYOJI
KOYAMA TAMAMI
SATO HAJIME

(54) METHOD FOR MEASURING LIPOPROTEIN CHOLESTEROL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring a lipoprotein cholesterol having a high accuracy and high general purpose properties without bringing about a cause for disturbing an optical measurement without influence of a blood component having a detergency in a sample having the lipoprotein of a serum, a plasma or the like and a measuring reagent. **SOLUTION:** The method for measuring a lipoprotein cholesterol for determining a compound consumed or generated by an enzyme reaction by operating the enzyme at a sample containing a lipoprotein comprises a first step of selectively reacting an HDL cholesterol or reacting a cholesterol except an LDL cholesterol by using a specific polymer compound and a first surfactant, and a second step of selectively reacting the LDL cholesterol by using a second surfactant by including determining the HDL cholesterol and/or the LDL cholesterol. A measuring reagent set is provided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-124780

(P2001-124780A)

(43) 公開日 平成13年5月11日 (2001.5.11)

(51) Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/92
C 1 2 N 9/02
9/04
9/16
C 1 2 Q 1/26

識別記号

F I
G 0 1 N 33/92
C 1 2 N 9/02
9/04
9/16
C 1 2 Q 1/26

テマコード(参考)
A 2 G 0 4 5
4 B 0 5 0
A 4 B 0 6 3
Z

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-307329

(71) 出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(22) 出願日 平成11年10月28日 (1999.10.28)

(72) 発明者 澤柳 豊治

神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和
電工株式会社総合研究所川崎研究室内

(72) 発明者 小山 珠美

神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和
電工株式会社総合研究所川崎研究室内

(74) 代理人 100094237

弁理士 矢口 平

最終頁に続く

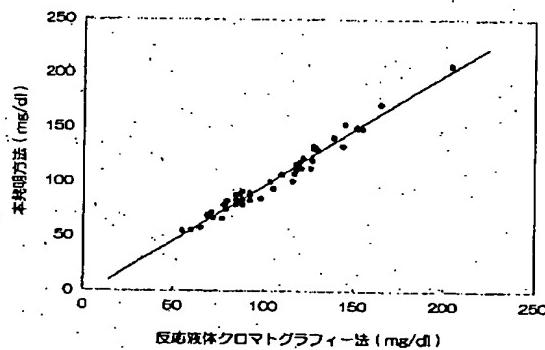
(54) 【発明の名称】 リポ蛋白質コレステロールの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 血清および血漿等のリポ蛋白質を含有する試料において、界面活性作用を有する血液成分の影響を受けず、かつ光学的な測定を妨害する要因を生成しない、高精度で汎用性の高いリポ蛋白質コレステロールの測定方法および測定試薬を提供すること。

【解決手段】 リポ蛋白質を含む試料に酵素を作用させ、酵素反応で消費されるあるいは生成される化合物を定量するリポ蛋白質コレステロールの測定方法において、特定の高分子化合物と第1界面活性剤を用いHDLコレステロールを選択的に反応させるかまたはLDLコレステロール以外のコレステロールを反応させる第1行程、次いで第2界面活性剤を用いてLDLコレステロールを選択的に反応させる第2行程からなり、HDLコレステロールおよび/またはLDLコレステロールを定量することを含むリポ蛋白質コレステロールの測定方法および測定試薬セット。

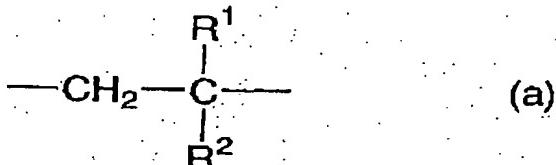
図1 実施例9/LDLコレステロール



【特許請求の範囲】

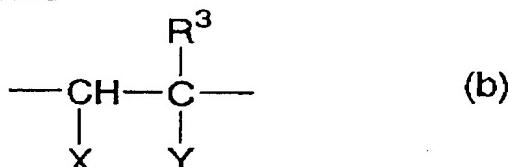
【請求項1】 リポ蛋白質を含む試料に酵素を作用させ、酵素反応で消費されるあるいは生成される化合物を*

*定量するリポ蛋白質コレステロールの測定方法において、(1)式(a)
【化1】



および式(b)

【化2】



の繰り返し単位[式中、R¹は炭素数4~30のアルキル基、R²およびR³は独立に水素原子あるいはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHであり、YはCOO H、SO₃H、PO(OH)₂を有する基またはそれらから誘導される基である。]を有し、(a) : (b) の質量比が1:9.9~9.9:1の範囲にある高分子化合物の共存下において、リポ蛋白質を含有する試料に酵素と第1界面活性剤を加えることにより、HDLコレステロールのみ選択的に酵素反応させるかまたはLDLコレステロール以外のコレステロールを選択的に酵素反応させる第1工程、次いで(2)第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールのみ選択的に酵素反応させる第2工程、(3)(1)の工程、あるいは(1)および(2)の工程において、酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロールおよび/またはLDLコレステロールを定量することを含むリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項2】 前記高分子化合物の分子量が5,000~500,000ダルトンである請求項1に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項3】 前記高分子化合物の濃度が0.001~1%の範囲である請求項1または2に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

10 【請求項4】 前記高分子化合物が、炭素数6~32の1-オレフィンとマレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸の共重合体、およびそれらの酸アミドからなる群より選ばれる1種以上の化合物である請求項1ないし3のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項5】 pHが5~9の範囲でコレステロールとコレステロール測定用酵素を反応させる請求項1ないし4のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

20 【請求項6】 第1界面活性剤が、胆汁酸誘導体および/または両性界面活性剤である請求項1ないし5のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

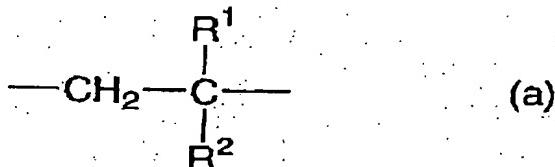
【請求項7】 第2界面活性剤を前記高分子と第1界面活性剤の共存下において用いることにより、第1界面活性剤により抑制されていたLDLコレステロールの酵素反応を選択的に酵素反応可能にすることを特徴とする請求項1ないし6のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

30 【請求項8】 第2界面活性剤が、ポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤の少なくとも1種である請求項1ないし7のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項9】 第2界面活性剤のHLBが、8.5以上12.6未満である請求項8に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

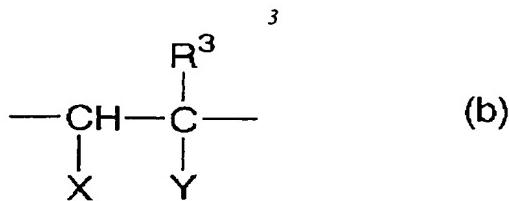
【請求項10】 酵素として、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用いる請求項1ないし9のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

40 【請求項11】 コレステロール測定用酵素、式(a)【化3】



および式(b)

【化4】



の繰り返し単位[式中、R¹は炭素数4～30のアルキル基、R²およびR³は独立に水素原子あるいはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHであり、YはCOO H、SO₃H、PO(OH)₂を有する基またはそれらから誘導される基である。]を有し、(a)：(b)の質量比が1：9.9～99：1の範囲にある高分子化合物、第1界面活性剤および第2界面活性剤からなり、請求項1ないし10のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法を用いることを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

【請求項12】 HDLコレステロールおよび／またはLDLコレステロールを定量することを特徴とする請求項11に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、主として臨床検査の分野での使用を目的とし、リポ蛋白質を含有する試料中の特定のリポ蛋白質分画コレステロールを定量する方法およびリポ蛋白質を含有する試料中の特定のリポ蛋白質分画コレステロールを定量する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 一般に、血中コレステロールは血液中のリポ蛋白質に含まれるものであり、動脈硬化症や心筋梗塞に関連性が深い診断的指標として重要視されている。また、リポ蛋白質はアポリポ蛋白質と脂質の複合体であり、比重によって高密度リポ蛋白質(以下、「HDL」という。)、低密度リポ蛋白質(以下、「LDL」という。)、超低密度リポ蛋白質(以下、「VLDL」という。)およびカイロミクロン(以下、「CM」という。)の4種類に大別される。

【0003】 古くから臨床検査において実施されてきた血中総コレステロールの測定は、血中の全てのリポ蛋白質に含まれるコレステロールを測定するもので、上記疾患の危険度を予測するものとして重要とされてきた。しかし、近年の臨床的研究においては、LDLに含まれるコレステロールが上記疾患のより正確なリスクファクターとされ、逆にHDLに含まれるコレステロールは負のリスクファクターすなわちHDLコレステロール量と上記疾患の発生頻度の間には負の相関が成り立つため、動脈硬化に関連する疾患の診断には、HDLあるいはLDLに含まれるコレステロールを個別に測定することがより重要であるとされている(動脈硬化25(1・2)：1-34, 1997)。

【0004】 これらリポ蛋白質の分析法としては、比重

4
の差を利用した超遠心法の他に電気泳動により分離したリポ蛋白質を脂質染色等により検出する方法や、HPLCにより分離した後にコレステロールを含むピークを酵素試薬により発色検出する反応液体クロマトグラフィー法、または免疫化学的方法等があるが、いずれも操作が煩雑であったり多数の検体を迅速に測定できない等の問題があり、日常的な検査にはほとんど用いられていないかった。

【0005】 過去、日常的な臨床検査においては、硫酸化デキストランやリンタングステン酸等のリポ蛋白質沈殿剤を用いてHDLコレステロールを測定する方法が用いられてきた。これらは、先ず血清等の検体にリポ蛋白質沈殿剤と2価の金属イオンを加えてHDL以外のリポ蛋白質を凝集させ、これを遠心分離により取り除き上清中に残存するHDL中のコレステロールを測定する。さらに血中総コレステロール値と中性脂肪値を測定し、経験的に導かれた Friedewald の式にこれらの値をあてはめて LDLコレステロール値を算出するものである。

【0006】 この方法は、超遠心法等に比較して簡便ではあるものの、沈殿剤を加えて遠心分離する操作を含むため、比較的多量の検体量を要し、短時間で多数の検体を処理することが困難であった。さらに、 Friedewald の式は、 VLDL 中のコレステロール量と中性脂肪量の比率がほぼ一定であるという経験則から導かれたものであるため、リポ蛋白質代謝あるいは脂質代謝に異常をきたす疾患では大きな誤差を生じるという問題があった。

【0007】 このような状況の中、血漿あるいは血清中のリポ蛋白質コレステロールの定量を、遠心分離等の前処理を行なう事なく自動分析装置で直接的に実施できる方法が開発されている。

【0008】 それらの中で、HDLコレステロールを直接測定するための手法としては、前述の沈殿法を応用してHDL以外のリポ蛋白質を凝集させて酵素が作用しない状態にしておきHDLコレステロールを選択的に反応させる方法(特開平8-131197号公報、特開平6-242110号公報、特開平11-56395号公報、特開平9-96637号公報、特開平9-285298号公報)、および界面活性剤等の沈殿剤以外の物質を用いてリポ蛋白質コレステロールの酵素反応をコントロールする方法(特開昭63-126498号公報、特開昭62-6999号公報、特開平9-299号公報)の2つに大別できるが、これらはいずれも汎用性や、正確性などにおいて十分に満足のいくものではなかった。

【0009】 その他に、リポ蛋白質凝集剤と界面活性剤を組み合わせた方法として、HDLに優先的に作用する界面活性剤とリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する物質の共存下でHDLを優先的に反応させ検出す

る方法（特開平11-56395号公報）、リポ蛋白質コレステロールの反応性をコントロールする糖化合物と界面活性剤の共存下でHDL以外のリポ蛋白質コレステロールを反応消去してHDLコレステロールを定量する方法（特開平7-301636号公報）等が開示されている。

【0010】一方、LDLコレステロールの直接測定試薬に関してもHDLコレステロールの直接測定試薬と同じような手法による測定方法が開示されており、リポ蛋白質凝集剤等を用いたLDLコレステロール測定方法としては、特開平6-213899号公報、特開平7-280812号公報、WO96/28734号公報、特開平10-311833号公報、特開平11-30617号公報等がある。また、界面活性剤を用いたLDLコレステロール測定方法としては、特開昭58-165800号公報、特開平10-84997号公報、特開平10-38888号公報などが開示されている。さらに、LDLのみに作用する化学修飾酵素を用いてLDLコレステロールを選択的に反応させ検出する方法（特開平10-80300号公報）も開示されている。

【0011】これらのリポ蛋白質コレステロールの選択的測定法は多くが界面活性剤あるいはリポ蛋白質の凝集剤を組み合わせてリポ蛋白質コレステロールの反応選択性をコントロールするものであるが、血液中には界面活性作用を有する成分が存在するため、界面活性剤の効果が血液成分の影響を受けやすいという問題がある。例えば、リポ蛋白質中に含まれるリン脂質であるレシチンは強い界面活性作用を持ち、コレステロールエステルの加水分解過程では界面活性作用を有する高級脂肪酸が生成する。血中のコレステロールは大部分が高級脂肪酸とのエステル体として存在し、コレステロールの測定にはこのエステル型コレステロールの加水分解過程が必須であるため、高級脂肪酸の生成は避けられない。さらに、エster型コレステロールの加水分解に用いるコレステロールエラーゼは哺乳動物の臍膜から得られるコレステロールエラーゼを除いて大部分が中性脂肪を加水分解する活性を併せ持つておらず、血中の中性脂肪の加水分解によっても高級脂肪酸が生成する。

【0012】界面活性剤の作用は、その濃度あるいは他の界面活性作用を持つ物質の共存等により大きく変化するが、血液中には界面活性剤を吸着する作用を有する血清アルブミンが存在し、血清を添加した試薬中の遊離の

界面活性剤濃度が変動する可能性がある。従って、血清アルブミン濃度、コレステロール濃度、中性脂肪濃度等に異常をきたした血清では、特定リポ蛋白のコレステロールが選択的に酵素反応するように設計された界面活性剤の効果を維持することが困難になり、目的とするリポ蛋白質コレステロールの測定精度が低下する傾向がある。

【0013】リポ蛋白質の凝集剤には血液成分の影響を受けるという問題は少ないものの、一方で特開平6-2

10 13899号公報で開示されているように、リポ蛋白質を添加した試薬の濁度を上昇させるという問題がある。現在のコレステロール測定法のほとんどがコレステロールの酸化還元反応によって生成した過酸化水素あるいは還元型補酵素を光学的な方法で定量する手法をとっている。リポ蛋白質の凝集により試薬試料混合液の濁度が上昇することで測定誤差が生じている。さらに、リポ蛋白質の凝集塊は自動分析装置の廃液ラインを詰まらせる危険性をも併せ持っている。従って、特定のリポ蛋白質コレステロールを正確に測定するためには特開平6-24

20 2110号公報で開示されているようなリポ蛋白質凝集塊の溶解工程や、特開平8-131195号公報で開示されているような反応速度を測定する工程が必要となる。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる状況に鑑みてなされたものであり、界面活性作用を有する血液成分の影響を受けず、かつ光学的な測定を妨害する要因を生成しない、高精度で汎用性の高いリポ蛋白質コレステロールの測定方法および測定試薬に関する。

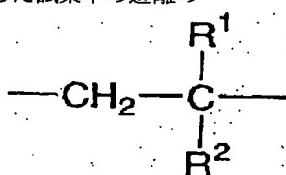
【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定の高分子化合物と界面活性剤を用いることにより、リポ蛋白質の凝集により反応液の濁度を上昇させることなく、精度よく簡便にリポ蛋白質コレステロールを測定できることを見出し本発明を完成するに至った。

【0016】すなわち本発明は次の事項に関する。

【1】リポ蛋白質を含む試料に酵素を作用させ、酵素反応で消費されるあるいは生成される化合物を定量するリポ蛋白質コレステロールの測定方法において、(1)式
40 (a)

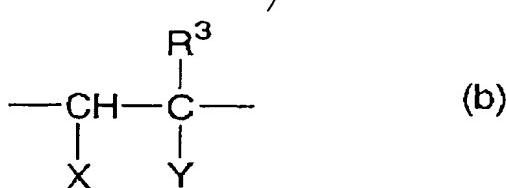
【化5】



(a)

および式(b)

【化6】

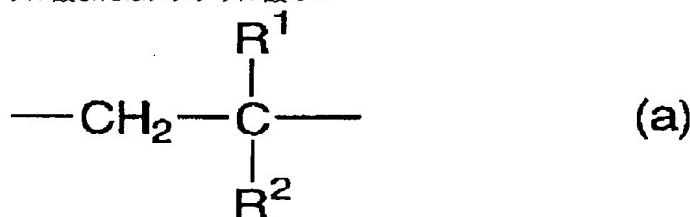


の繰り返し単位[式中、R¹は炭素数4～30のアルキル基、R²およびR³は独立に水素原子あるいはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHであり、YはCOO H、SO₃H、PO(OH)₂を有する基またはそれらから誘導される基である。]を有し、(a)：(b)の質量比が1：99～99：1の範囲にある高分子化合物の共存下において、リポ蛋白質を含有する試料に酵素と第1界面活性剤を加えることにより、HDLコレステロールのみ選択的に酵素反応させるかまたはLDLコレステロール以外のコレステロールを選択的に酵素反応させる第1工程、次いで(2)第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールのみ選択的に酵素反応させる第2工程、(3)(1)の工程、あるいは(1)および(2)の工程において、酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロールおよび／またはLDLコレステロールを定量することを含むリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

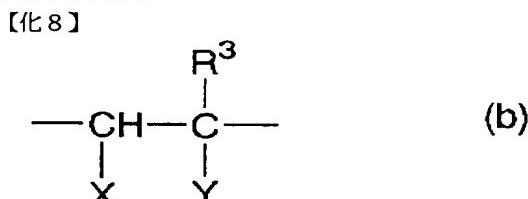
[2] 前記高分子化合物の分子量が5,000～500,000ダルトンである上記[1]に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

[3] 前記高分子化合物の濃度が0.001～1%の範囲である上記[1]または[2]に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

[4] 前記高分子化合物が、炭素数6～32の1-オレフィンとマレイン酸、アクリル酸またはメタクリル酸の*



および式(b)



の繰り返し単位[式中、R¹は炭素数4～30のアルキル基、R²およびR³は独立に水素原子あるいはメチル基であり、Xは水素原子またはCOOHであり、YはCOO H、SO₃H、PO(OH)₂を有する基またはそれらから誘導される基である。]を有し、(a)：(b)の質量比が1：99～99：1の範囲にある高分子化合物、第1界面活性剤および第2界面活性剤からなり、上記[1]ないし[10]のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法を用いることを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

[12] HDLコレステロールおよび／またはLDLコレステロールを定量することを特徴とする上記[11]に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明は、上記式(a)および式(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物が、光学的測定を妨害するリポ蛋白質の凝集塊を形成することなく、LDLコレステロールとコレステロール測定用酵素との反応を選択的に抑制し、かつその反応抑制効果が高級脂肪酸等の界面活性作用を有する血中成分の影響を受けないという特徴を有する新しい知見に基づいている。類似の作用を示す化合物については既に多数開示されており、例えば、特開平6-213899号公報において開示されている水溶性櫛型ポリマーはLDLに選択的に作用するがLDL凝集物を形成して反応液の濁度を上昇させる点で、本発明の高分子化合物と異なる。また、特開平9-121895号公報で開示されているアクリル酸/メタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマーは、LDLの他にVLDLにも作用してその酵素反応を阻害する点で、本発明の高分子化合物と異なっている。さらにヘパリン、硫酸化デキストラン、リンタングステン酸等のリポ蛋白質凝集剤は、2価金属イオンの共存下でのみLDLおよびVLDLの凝集活性と酵素反応阻害活性が発現するという点において本発明の高分子化合物とは明確に異なるものである。

【0019】本発明の(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物は、高級アルキル基を有するモノマー単位とアニオン性基を有するモノマー単位から構成される高分子化合物である。式(a)においてR¹は炭素数が4以上のアルキル基が好ましく、ブチル、シクロヘキシル、オクチル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル基等が例示できるが、これらの中でも効果の点から特にドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル基が好ましい。アルキル基が無いものあるいはその炭素数が3以下のものはLDLコレステロールの反応を抑制する効果が低いため好ましくない。また側鎖YとしてはCOOH、CONH₂、CONHC₂H₂OH、CONHNH₂、CH₂COOH、COOC₂H₄COOH、COOC₂H₄SO₃H、COOC₂H₂PO(OH)₂、CONHC₂H₂SO₃H、CH₂OC₆H₆SO₃H等が挙げられるが、これらの中でもCOOH、CONH₂、CONHC₂H₂OH、CONHNH₂が好ましい。

【0020】(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物としては、たとえば、炭素数6~32の1-オレフィンと、アクリル酸、メタクリル酸またはマレイン酸の共重合体もしくはこれらの酸アミドまたはエステル類などが挙げられ、これらの中でも特にポリ(1-エイコセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-ノナデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-オクタデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-ヘプタデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-ヘキサデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-ペンタデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-テトラデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-トリデセン-*c*o-マレイン酸)、ポリ(1-

10
ードデセン-*c*o-マレイン酸)、およびそれらの酸アミド、ポリ(1-エイコセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-ノナデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-オクタデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-ヘプタデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-ヘキサデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-ペンタデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-テトラデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-トリデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-ドデセン-*c*o-アクリル酸エステル)、ポリ(1-エイコセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-ノナデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-オクタデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-ヘプタデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-ヘキサデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-ペンタデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-テトラデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-トリデセン-*c*o-メタクリレート)、ポリ(1-ドデセン-*c*o-メタクリレート)が好ましい。

【0021】上記(a)と(b)の比率は1:99~99:1であり、好ましくは10:90~90:10、より好ましくは20:80~80:20である。また、本発明の高分子化合物は、繰り返し単位(a)と(b)以外にさらに他の繰り返し単位を含んでいても構わない。

【0022】液体クロマトグラフィーで測定した上記(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物の質量平均分子量は5,000~500,000ダルトンが好ましく、より好ましくは10,000~100,000ダルトンである。質量平均分子量が5,000ダルトン未満だと高分子化合物の効果が小さいため好ましくなく、500,000ダルトンを超えると製造工程上粘度の問題を生じるため好ましくない。

【0023】本発明の(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物は、LDLコレステロールの酵素反応を選択的に抑制する特徴を持つため、LDLコレステロールの酵素反応を抑制する化合物の共存下でLDL以外のリポ蛋白質のコレステロールを一部あるいは全部消去した後に、LDLコレステロールを選択的に酵素反応させ定量する原理に基づいたLDLコレステロールの測定方法に用いると、その特徴がより効果的に発揮されるが、HDL以外のリポ蛋白質の反応を抑制する物質の共存下でHDLを選択的に酵素反応させる原理に基づいたHDLコレステロールの測定方法にも応用できる。すなわち、本発明の(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物を添加することにより、HDLコレステロールが反応する際に生成する界面活性作用を有する成分等によって、LDLコレステロールの反応を抑制している界面活性剤等の抑制効果が低下しLDLコレステロールが反応することを防止できるため、精度の高

11

いHDLコレステロールの定量を行うことができるという特徴を有する。

【0024】リポ蛋白質を含む試料に上記(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物を接触させる時の高分子化合物の濃度は、リポ蛋白質を含む試料中のLDL含有量に依存するが、リポ蛋白質を含む試料が血清あるいは血漿の場合には0.001~1質量百分率(以下、質量百分率を「%」という。)がよく、好ましくは0.01~0.3%の範囲である。高分子化合物の濃度が0.001%未満の場合は添加効果が充分得られないため好ましくなく、1%を超えると酵素の活性に影響する場合があるため好ましくない。

【0025】上記(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物はその効果の発現に際し、2価金属イオンの共存を必要としない。従って2価金属イオンを添加する必要はないが、特に制限するものではなく、添加して用いても構わない。

【0026】また本発明は、コレステロール測定用酵素と界面活性剤との組み合わせにより第1工程において、リポ蛋白質を含有する試料に高分子化合物、コレステロール測定用酵素および第1界面活性剤を加えることによりHDLコレステロールを酵素と反応させ、次いで、第2工程で前記高分子化合物と第一界面活性剤存在下にさらに第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールを選択的に酵素と反応させ、消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロールとLDLコレステロールを精密かつ迅速に測定することができる。

【0027】また、本発明はコレステロール測定用酵素と界面活性剤との組み合わせによっては、第1工程でLDL以外のリポ蛋白質を全て酵素と反応させることができ、次いで、第2工程でさらに第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールを選択的に酵素と反応させ、消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、LDLコレステロールを精密かつ迅速に測定することができる。

【0028】本発明において用いる第1界面活性剤は、第一工程において、酵素との協同作用によってHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制するか、またはLDLに含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する界面活性剤であって、第二工程においては第2界面活性剤と協同的に作用してLDLコレステロールの酵素反応を促進する機能を有するものであればいずれのものを用いてもよい。

【0029】例えば、胆汁酸誘導体として胆汁酸およびその塩、両性界面活性剤としてラウリルカルボキラウリルカルボキヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB3-14), N-Hexadecyl-

10

12

-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB-16)、N-Octyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB3-8)、N-Octadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB3-18)、N-Decyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB3-10)、N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate(SB-12)、または、胆汁酸誘導体でありかつ両性界面活性剤である3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate(CHAPS)もしくは3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]2-hydroxypropanesulfonate(CHAPSO)等があげられ、これらのなかでも胆汁酸、CHAPS, CHAPSO, SB3-14等が好ましく用いられる。

20

【0030】例えば第一工程において、第1界面活性剤と酵素との協同作用によってHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する場合の例として、コール酸ナトリウムとPseudomonas属由来のコレステロールエステラーゼ、Pseudomonas属由来のコレステロールオキシダーゼの組み合わせが挙げられ、また、第一工程において、第1界面活性剤と酵素との協同作用によってLDLに含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する場合の例として、コール酸ナトリウムと脾臓由来のコレステロールエステラーゼ、Streptomyces属由来のコレステロールオキシダーゼの組み合わせが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

30

【0031】また、用いる第1界面活性剤の濃度は選択した界面活性剤に応じて決められる。例えば、胆汁酸、CHAPS, CHAPSOまたはSB3-14の場合は、0.01~1%、好ましくは0.03~0.5%である。

40

【0032】本発明において、LDLコレステロールを測定する場合に添加する第2界面活性剤は、第1工程でHDLコレステロールまたはLDL以外のコレステロールが反応した後の試料に対して、本発明の高分子化合物と第1界面活性剤の共存下で添加使用される。

【0033】すなわち、本発明のLDLコレステロールの測定は、第1工程でHDLコレステロールのみ反応させてその他のリポ蛋白質が全て残存する場合には、第2工程においてLDLコレステロールの酵素反応を促進しかつLDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する機能を有する第2界面活性剤を添加してLDLコレステロールを反応させて行われ

る。

【0034】または第1工程でLDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールを反応させLDLコレステロールだけが残存する場合には、第2工程において高分子化合物と第1界面活性剤の共存下でLDLコレステロールの酵素反応を促進する第2界面活性剤を添加してLDLコレステロールを反応させて実施される。

【0035】本発明において用いる第2界面活性剤としては、本発明の目的に適合するものであれば特に制限はない。本発明の(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物の存在下でHDL以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する第1界面活性剤として、例えば胆汁酸誘導体あるいは両性界面活性剤を用い、第1工程でHDLコレステロールのみを反応させた場合において、第2工程でLDLコレステロールのみの酵素反応を促進しかつLDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する第2界面活性剤としては、HLB値が8.5以上12.6未満、好ましくはHLB値が9以上11未満、さらに好ましくはHLB値が9.5以上10.7未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤が用いられる。これによりLDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールの反応抑制効果は維持されるがLDLコレステロールに対する反応抑制が選択的に解除され、LDLコレステロールの反応が促進される。しかしこの場合HLB値が8.5未満かあるいは12.6を超える場合は、LDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールの反応も促進されるため好ましくない。本発明において用いる第2界面活性剤は、単独で添加しても良いが、数種を混合しHLB値を調整して添加してもよい。

【0036】また、第1工程でLDLコレステロール以外のリポ蛋白質コレステロールを反応させた場合、すなわち残存するリポ蛋白質コレステロールがLDLコレステロールのみの場合には、第1界面活性剤の共存下でLDLコレステロールを反応させるため、やはりHLB値が8.5以上12.6未満、好ましくはHLB値が9以上11未満、さらに好ましくはHLB値が9.5以上10.7未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤を用いることが好ましい。この場合、さらに酵素反応を短時間に確実に完結させる目的で複数の界面活性剤を添加することもできる。例えば酵素反応を早めるための他の界面活性剤として上記のHLB値が8.5以上12.6未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤と同様にポリオキシエチレン鎖を有し、上記界面活性剤よりHLBのより大きな界面活性剤であるノニデットP-40(HLB13)やトリトンX-100(HLB13.5)等が例示できる。

【0037】ポリオキシエチレン鎖を有する界面活性剤は、特開平9-299号公報においてHDL以外のリポ蛋白質分画中のコレステロールに対する酵素の作用を抑

制する界面活性剤として開示されており、また特開平10-38888号公報ではHLB値が11以上13未満のポリアルキレンオキサイド誘導体が全てのリポ蛋白質に作用し、HLB値が13以上15未満のポリアルキレンオキサイド誘導体がLDL以外のリポ蛋白質に作用することが開示されているが、これらの界面活性剤のリポ蛋白選択性に対する効果は、本発明の(a)および

(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物、コール酸等の第1界面活性剤と第2界面活性剤との併用による効果とは全く異なるものである。

【0038】HLB値が8.5以上12.6未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤として、単独組成のものとしては(ポリオキシエチレン)5-ノニルフェニルエーテル、(ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)8-オレイルエーテル、(ポリオキシエチレン)6-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)10-セチルエーテル、(ポリオキシエチレン)6-ノニルフェニルエーテル、(ポリオキシエチレン)8-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)9-ノニルフェニルエーテル等が挙げられ、また數種類の界面活性剤を混合してHLB値を調整したものとしては、(ポリオキシエチレン)2-ステアリルエーテルと(ポリオキシエチレン)9-ラウリルエーテルの混合物等が例示される。

【0039】なお、ノニオン性界面活性剤のHLB値は、例えば「新・界面活性剤入門」(藤本武彦著、昭和48年、三洋化成工業株式会社発行)等の周知の方法で算出することができる。

【0040】LDLコレステロールを反応させるために使用する第2界面活性剤はコレステロール測定用酵素を失活させない濃度範囲内において用いられる。第2界面活性剤の添加濃度は選択した界面活性剤の種類に応じて決められ、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテルの場合は0.01~1%、好ましくは0.1~0.4%である。

【0041】本発明に使用するコレステロール測定用酵素としては、通常コレステロールを測定するために使用されるコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを使用することができ、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼ、またはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる。特に、*Pseudomonas*属等の微生物由来のコレステロールエステラーゼは中性脂肪を加水分解する活性が高いので、本発明の高分子化合物を共存させることによって大きな効果が得られる。

【0042】本発明では第1工程で第1界面活性剤とコレステロール測定用酵素との組み合わせにより、HDLコレステロールが反応する場合と、LDL以外のリポ蛋白質コレステロールが反応する場合がある。表1に界面

活性剤の種類とコレステロール測定用酵素との組み合わせによる第1工程でのリポ蛋白質コレステロールの反応例を示す。

*

*【0043】

【表1】

L P 第1工程	A	B	C
L D L 以外	Pseudomonas	他微生物	コール酸 Na
H L D	Pseudomonas	Pseudomonas	コール酸 Na
H L D	Pseudomonas	Streptomyces	コール酸 Na
H L D	Pseudomonas	他微生物	CHAPS
H L D	Pseudomonas	Pseudomonas	CHAPS
H L D	Pseudomonas	Streptomyces	CHAPS
L D L 以外	Pseudomonas	他微生物	SB3-14
H L D	臍臓	他微生物	コール酸 Na
H L D	臍臓	Pseudomonas	コール酸 Na
L D L 以外	臍臓	Streptomyces	コール酸 Na
H L D	臍臓	他微生物	CHAPS
L D L 以外	臍臓	Streptomyces	SB3-14

【0044】L P 第1行程：第1工程で反応するリポ蛋白質の種類／H.D L = H D L コレステロール、L D L 以外=L D L 以外のリポ蛋白質コレステロール、

A：コレステロールエステラーゼの起源／P seudo monas=Pseudomonas 属由来、臍臓=臍臓由来、

B：コレステロールオキシダーゼの起源／他微生物=微生物由来、Pseudomonas=Pseudomonas 属由来、Streptomyces=Streptomyces 属由来、

C：第1界面活性剤種類／コール酸Na=コール酸ナトリウム、CHAPS=3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate、SB3-14=N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate

【0045】本発明において用いるコレステロール測定用酵素の濃度は、試料中のコレステロールの濃度、反応温度および反応時間等により設定する。例えば、リポ蛋白質を含む試料が血清または血漿であり10分間程度で反応させる場合にはコレステロールエステラーゼの濃度は0.1U/ml～50U/ml、コレステロールオキシダーゼの濃度は0.1U/ml～10U/mlが好ましい。

【0046】本発明においてリポ蛋白質を含む試料を測定する際のpHは5～9の範囲において測定するのが好ましく、本発明の高分子化合物の効果をより高めるためにはpH6～8の範囲がより好ましい。pHが5未満または9を超えた場合は、本発明の高分子化合物の効果が十分に発揮されにくいため好ましくない。

【0047】本発明において用いるpH緩衝剤に特に制限はなく、設定したpHに対応するpKaを持つ1～200mMのpH緩衝剤により調節することができる。pH緩衝剤としてN-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルフォネート)(HEPE S)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルフオネート)(PIPES)、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルfonylate(MOPS)などが例示できる。

【0048】また本発明においては、(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物や酵素の活性あるいは界面活性剤の作用に影響しないものであれば任意の物質を共存させることができる。例えば、塩化ナトリウム、リン酸カリウム等の塩類、血清アルブミン等の蛋白質、アスコルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼ、カタラーゼ等の酵素、コレステロールの酵素反応生成物を定量するための色素原体等が挙げられる。

【0049】本発明において反応に要する時間は試料中に含まれるコレステロール量、酵素濃度、反応温度、界

面活性剤濃度ならびに(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物濃度等で決定される。また、本発明により測定される特定のリポ蛋白質コレステロールの濃度は、コレステロールが酵素反応により生成するあるいは消費される物質を定量する一般的な方法で知ることができる。例えば、コレステロール測定用酵素としてコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを用いた場合、コレステロールが反応して生成した過酸化水素をパーオキシダーゼの共存下において4-アミノアンチピリンとN-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルフォプロピル)-3-メチルアニリン(以下、「TOOS」という。)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルフォプロピル)-3,5ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルフォプロピル)-3,5ジメトキシー-4-フルオロアニリン(FDAOS)等のトリンダー試薬の酸化縮合反応により生じる色素の濃度として吸光度で測定することができる。

【0050】本発明による特定のリポ蛋白質コレステロールの検出は、コレステロール測定用酵素としてコレステロールエステラーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼを用いた場合、コレステロールが反応して生成したNAD(P)Hを、例えば340nmの吸光度における紫外吸収で測定したり、ホルマザン色素を形成させて比色定量することができる。

【0051】また、本発明による特定のリポ蛋白質コレステロールの検出は、特定のリポ蛋白質コレステロールが反応する際に消費される酸素を酸素電極によって測定することによって也可能である。

【0052】以下、本発明によるリポ蛋白質コレステロールのより具体的な測定手法について述べる。本発明の方法によりHDLコレステロールおよびLDLコレステロールを定量する場合、血清等の試料に、例えばアスコルビン酸オキシダーゼと4-アミノアンチピリン等からなる第1試薬を添加して検体中のアスコルビン酸を消去する。次いで第2試薬として、HDLコレステロールのみを反応させる組み合わせの第1界面活性剤、コレステロール測定用酵素、(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物、パーオキシダーゼおよびトリンダー試薬を添加することによりHDLコレステロールのみが反応する。生成した過酸化水素をパーオキシダーゼの作用で4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬の酸化縮合反応により生じる色素の濃度を吸光度測定することにより高精度にHDLコレステロールの測定ができる。次いで高分子化合物存在下においてもLDLコレステロールのみの酵素反応を促進しかつLDL以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する第2界面活性剤からなる第3試薬を添加し、LDLを選択的に酵素と反応させ生成した過酸化水素を上記の検出系に導き高精度にLDLコレステロールの測定ができる。

【0053】また、HDLコレステロールを定量する必要がなくLDLコレステロールを定量する場合、上述のアスコルビン酸の消去工程とHDLコレステロールの反応工程を同時にを行い、さらにHDLコレステロールの酵素反応で生成する過酸化水素を同一工程内で消去する事により2試薬でLDLコレステロールの測定を行う事ができる。

【0054】すなわち、血清等の試料に、例えばアスコルビン酸オキシダーゼ、HDLコレステロールのみを反応させる組み合わせの第1界面活性剤、コレステロール測定用酵素、(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物、カタラーゼおよびトリンダー試薬等からなる第1試薬を添加して試料中のアスコルビン酸を消去すると共に、HDLコレステロールから生成する過酸化水素をカタラーゼによって分解消去した後、次いでカタラーゼの阻害剤であるアジ化ナトリウム、LDLコレステロールのみの酵素反応を促進しかつLDL以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する第2界面活性剤、パーオキシダーゼおよび色素原体の4-アミノアンチピリン等からなる第2試薬を添加して、HDLコレステロールを定量することなく高精度にLDLコレステロールを測定する事ができる。

【0055】あるいは過酸化水素の消去にカタラーゼを使用せず、4-アミノアンチピリン二量体に導くことによって同一工程内でHDLコレステロールの酵素反応で生成する過酸化水素の消去を行うことができる。例えば上述の、カタラーゼを利用した過酸化水素消去法の第1試薬としてのカタラーゼとトリンダー試薬の代わりに、パーオキシダーゼと4-アミノアンチピリンを配合し、HDLコレステロールから生成する過酸化水素を無色の4-アミノアンチピリン二量体に導き、第2試薬には4-アミノアンチピリンの代わりにトリンダー試薬を添加することでHDLコレステロールを定量することなく精度よくLDLコレステロールを測定することができる。

【0056】あるいはまた、第1工程でコレステロール測定用酵素と第1界面活性剤の組み合わせによりLDLコレステロール以外のリポ蛋白質を反応させる系を選択することもできる。この場合もLDLコレステロール以外のリポ蛋白質から生成する過酸化水素を、カタラーゼによって分解するかもしくは無色の4-アミノアンチピリン二量体に導く方法を利用して、精度よくLDLコレステロールを測定することができる。

【0057】また、LDLコレステロールを定量する必要がなく、HDLコレステロールを定量したい場合、例えば前述のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールを定量する場合において、第1工程と第2工程を行ってHDLコレステロールのみを測定してもよい。

【0058】

【本発明の効果】このように本発明は、特定の高分子と

複数の界面活性剤を組み合わせて用いることでリポ蛋白質の反応性を制御する点に特徴を有するものであり、反応液の濁度を上昇させるリポ蛋白質凝集剤を必要とせず、またLDLコレステロールを反応させる工程で新たに別の酵素を加える必要もなく、コレステロール測定に用いられる通常の酵素を用いてHDLコレステロール量および/またはLDLコレステロール量を精度良く定量することができるため、臨床検査などの分野に有用である。

【0059】

【実施例】以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。

【0060】(製造例)直鎖の1-オレフィンと無水マレイン酸の共重合体0.1gを100mlの1N水酸化ナトリウム溶液に懸濁して70°Cで2時間加熱した後、1N塩酸でpH7.0に中和して透析膜で12時間脱塩することにより上記(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物を得た。

【0061】(実施例1)本発明における上記(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物の違いによるコレステロールの反応抑制効果を第1界面活性剤共存下で比較した。

【0062】[試薬組成]

1) コレステロール測定用酵素溶液(I)

0.1%コール酸ナトリウム、1U/ml *Pseudomonas*属微生物由来のコレステロールエステラーゼ、1U/ml *Streptomyces*属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、3U/ml パーオキシダーゼ、1mM 4-アミノアンチビリン、1mM TOOS、150mMの塩化ナトリウム、30mMのMOPS pH7.0

2) コレステロール測定用酵素溶液(II)

0.1%コール酸ナトリウム、1U/ml 脳臓由来のコレステロールエステラーゼ、1U/ml *Streptomyces*属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、3U/ml パーオキシダーゼ、1mM 4-アミノアンチビリン、1mM TOOS、150mMの塩化ナトリウム、30mMのMOPS pH7.0

【0063】[測定方法]超遠心法により分離したリポ蛋白質分画を、コレステロール測定用酵素溶液(I)またはコレステロール測定用酵素溶液(II)100容に対して1容の割合で加えて37°Cで10分間反応させ、反応したコレステロール量に比例する反応液の吸光度(主波長550nm/副波長700nm)を測定した。各リポ蛋白質分画中のコレステロール濃度はHDL分画が約100mg/dl、VLDL分画が約50mg/dl、LDL分画が約200mg/dlである。

【0064】次に、コレステロール測定用酵素溶液(I)と(II)に製造例と同様の方法で調製した高分子化合物を添加し、無添加系と同様にしてリポ蛋白質分画を反応させ、反応液の吸光度(主波長550nm/副波長700nm)を測定した。高分子化合物を添加しないコレステロール測定用酵素溶液で得られた吸光度を基準にして、高分子化合物のリポ蛋白質コレステロールに添加系の酵素反応抑制率を算出した。

【0065】表2に高分子化合物のアルキル基(R¹)の炭素数(C1~C26)、側鎖Y、質量平均分子量、使用濃度および高分子化合物のコレステロール反応抑制効果を示した。なお、XはCOOHあるいはそのナトリウム塩である。また、リポ蛋白質コレステロールの反応抑制効果は反応抑制率0~5%を-、5~30%を+、30~80%を++、80~100%を+++と評価した。

【0066】

【表2】

本発明の高分子化合物				コレステロールの反応抑制効果					
R ¹	Y 側鎖	分子量	濃度 (%)	コレステロール測定用 酵素溶液I系			コレステロール測定用 酵素溶液II系		
				HDL	VLDL	LDL	HDL	VLDL	LDL
C1	COOH	100000	0.1	-	-	-	-	-	-
C2	COOH	80000	0.1	-	-	-	-	-	-
C4	COOH	50000	0.1	-	+	++	-	-	++
C18	COOH	120000	0.05	-	++	+++	-	-	+++
C12	COOH	10000	0.05	-	+++	+++	-	-	+++
C16	COOH	40000	0.05	-	+++	+++	-	-	+++
C26	COOH	70000	0.005	-	+++	+++	-	-	+++
C16	CONH ₂	40000	0.05	-	+++	+++	-	-	+++

【0067】表2に示すように、*Pseudomonas* 属微生物由来のコレステロールエステラーゼと *Streptomyces* 属微生物由来のコレステロールオキシダーゼをコレステロール測定用酵素として使用した場合、高分子化合物と第1界面活性剤の共存下において、R¹のアルキル基炭素数が4以上の化合物がLDLコレステロールとVLDLコレステロールの酵素反応を選択的に抑制することがわかる。また、脾臓由来のコレステロールエステラーゼと *Streptomyces* 属微生物由来のコレステロールオキシダーゼをコレステロール測定用酵素として使用した場合、高分子化合物と第1界面活性剤の共存下において、R¹のアルキル基炭素数が4以上の化合物がLDLコレステロールの酵素反応を選択的に抑制することがわかる。

【0068】(実施例2) 血清と混合した場合の濁度変化を指標にして、本発明の第1界面活性剤と高分子化合物を配合した試薬の光学特性をリソタングスチレン酸法と*

*比較した。試薬は、まず実施例1で用いたコレステロール測定用酵素溶液(I)から色素原体であるTOSO₂Sを除き、コレステロールが反応して過酸化水素が発生しても色素を形成しないリポ蛋白質反応試薬(I)を調製した。さらに本発明の高分子として製造例と同様の方法で調製したポリ(1-オクタデセン-*cis*-マレイン酸)を0.05%添加してリポ蛋白質反応試薬(II)を調製した。比較対照用としてリソタングスチレン酸0.1%および塩化マグネシウム100mMを添加したりポ蛋白質凝集試薬を調製した。

【0069】リポ蛋白質反応試薬(I)、(II)、リポ蛋白質凝集試薬にそれぞれ血清を反応させ、血清添加前後の反応液の吸光度差(主波長550nm/副波長700nm)によって濁度変化を測定した結果を表3に示す。

【0070】

【表3】

血清添加前後の濁度変化 (550nm/700nm)			
血清 No.	リポ蛋白質反応試薬 I (添加物なし)	リポ蛋白質反応試薬 II (本発明高分子化合物)	リポ蛋白質凝集試薬
1	0.002	0.002	0.019
2	0.003	0.002	0.021
3	0.001	0.001	0.015
4	0.003	0.004	0.018
5	0.002	0.002	0.016
6	0.002	0.002	0.027
7	0.004	0.004	0.022
8	0.001	0.003	0.021
9	0	0.002	0.014
10	0.003	0.003	0.020

本発明で使用する界面活性剤を単独または高分子化合物と共に配合した試薬を血清と混合しても濁度は上昇せず、本発明方法によれば精度の高い光学測定が可能であることがわかる。

【0071】(実施例3~8および比較例1~2) 本発明 第1試薬

明の高分子化合物、第1界面活性剤および第2界面活性剤によるリポ蛋白質の選択性を実施例3~8および比較例1~2に示す。

【0072】[試薬組成]

23

0.07% コール酸ナトリウム、0.05% ポリ(1-オクタデセン-1-オーマレイン酸)、2 U/ml Pseudomonas 属微生物由来のコレステロールエステラーゼ、2 U/ml Pseudomonas 属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、3 U/ml パーオキシダーゼ、1 mM 4-アミノアンチピリン、1 mM TOOS、150 mM NaCl、30 mM MOPS pH 7

【0073】2) 第2試薬

150 mM NaCl、30 mM のMOPS pH 7 に下記(A)～(H)のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤を0.2% 添加し8種類の第2試薬を調製した。

(A) 実施例3：(ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル

(HLB値9.6／花王株式会社製エマルゲン104P)

(B) 実施例4：(ポリオキシエチレン)8-オレイルエーテル

(HLB値10.0／花王株式会社製エマルゲン408)

(C) 実施例5：(ポリオキシエチレン)10-セチルエーテル

(HLB値10.7／花王株式会社製エマルゲン210P)

(D) 実施例6：(ポリオキシエチレン)8-ラウリルエーテル

(HLB値12.1／花王株式会社製エマルゲン108)

(E) 実施例7：(ポリオキシエチレン)3-ノニルフェニルエーテル(HLB=7.8／花王株式会社製エマルゲン903)と(ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル(HLB値=9.6／花王株式会社製エマルゲン104P)を混合して調製したHLB=8.5の界面活性剤

(F) 実施例8：(ポリオキシエチレン)9-ノニルフェニルエーテル

(HLB=12.6／花王株式会社製エマルゲン909)

(G) 比較例1：(ポリオキシエチレン)3-ノニルフェニルエーテル

(HLB=7.8／花王株式会社製エマルゲン903)

(H) 比較例2：(ポリオキシエチレン)10-オクチルフェニルエーテル

(HLB=13.1／花王株式会社製エマルゲン810)

【0074】[測定方法] 血清をアスコルビン酸オキシ

24

ダーゼ(5 U/ml)を含む150 mM 塩化ナトリウム水溶液で10倍に希釈して37℃で5分間加温した後に、その0.1 mlを予め37℃に加温した第1試薬0.9 mlに混和して37℃で5分間反応させ(第1工程)、更に(A)～(H)の界面活性剤をそれぞれ添加した第2試薬1 mlを追添して37℃で5分間反応させ(第2工程)、全反応工程の反応液の吸光度(主波長550 nm/副波長700 nm)を経時的に測定した。

(第2界面活性剤(A)～(H)はそれぞれ実施例3～8および比較例1～2に使用。)別にコレステロール換算で50 mg/dl相当のコレステロールパルミテートを0.1% Triton X-100水溶液に懸濁して調製した標準液を適宜希釈した。希釈標準液0.1 mlに血清と同様に第1試薬と第2試薬を反応させて、吸光度変化量と標準液コレステロール濃度から検量線を作成した。作成した検量線を基準として血清中のコレステロール濃度を算出した。

【0075】対照法として、反応液体クロマトグラフィー法で同一の血清のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールを定量した。Shodex (昭和電工株式会社登録商標) KW-804カラム(昭和電工株式会社製)を用い150 mM 磷酸緩衝液(pH 7.0)を溶離液として血清中のリポ蛋白質を分離し、カラム出口に溶出液とコレステロール検出液を混合させる反応コイルを接続して、反応コイル中でカラム溶出液とコレステロール検出液混合物を45℃で3分間反応させた後に、550 nmの吸光度を測定することによってリポ蛋白質各分画のコレステロール量を測定した。

【0076】なお、コレステロール検出液はPseudomonas 属微生物由来のコレステロールエステラーゼ(10 U/ml)、Pseudomonas 属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ(10 U/ml)、パーオキシダーゼ(20 U/ml)、4-アミノアンチピリン(2 mM)およびTOOS(2 mM)を含む0.5% Triton X-100溶液であり、溶出液と1:1に混合するように反応コイルへの流入量を調節した。また、クロマトグラム中のピークは超遠心法によって分離したHDL、LDL、VLDL 分画を用いて同定した。

【0077】実施例3～8および比較例1～2について、第1工程で反応した血清中のコレステロール濃度(平均)と第2工程で反応した血清中のコレステロール濃度、反応液体クロマトグラフィー(HPLC)によって定量した同一血清中のHDLコレステロール濃度およびLDLコレステロール濃度を表4にまとめて示す。

【0078】

【表4】

血清 No.	HPLC法		本法									
			第1工程		第2工程							
	HDL 分画	LDL 分画	平均値			実施例						比較例
			HDL	LDL	3	4	5	6	7	8	1 2	
11	41	139	43	143	141	136	144	133	138	155	151	
12	49	117	47	120	121	114	120	122	119	139	136	
13	37	154	38	151	155	152	155	149	155	167	177	
14	67	79	64	84	74	82	82	78	81	93	89	
15	32	169	33	171	166	172	174	171	167	188	194	
16	44	136	48	131	133	136	139	141	134	149	155	
17	51	147	49	151	144	142	143	139	145	168	177	
18	58	121	61	120	124	116	121	119	124	135	132	
19	39	158	41	161	156	161	161	152	156	188	199	
20	55	177	52	172	175	171	181	179	173	198	194	

【0079】表4に示すように、第1工程で反応するコレステロールは、反応液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定したHDLコレステロールと高い相関を示し、また、第2界面活性剤としてHLB値が8.5以上12.6未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤を用いた場合には、第2工程で反応するコレステロールは反応液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定したLDLコレステロールと高い相関を示した。

【0080】(実施例9～15)本発明の測定例を実施例9～15に示す。実施例9に、本発明によるHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの測定例を、実施例10～14に本発明によりHDLコレステロールを測定せずLDLコレステロールを測定した場合の測定例を示し、実施例15に本発明によりLDLコレステロールを測定せずHDLコレステロールを測定した場合の測定例を示した。

【0081】日立7070型自動分析装置(株式会社日立製作所製)を用いて、血清50検体を被検試料として本発明の方法によりリポ蛋白質コレステロールを測定した。反応条件としては、37℃で各試薬添加後約5分反応させた後、反応液の吸光度変化(550nm/700nm)を測定して、濃度既知のリポ蛋白質コレステロールキャリブレーター(試料ブランク=精製水)を用いて血清中のHDLコレステロール濃度またはLDLコレステロール濃度を算出した。測定には、アルキル基

(R')炭素数が16で、(a)および(b)の繰り返し単位を有する高分子化合物として、ポリ(1-オクタ

デセン-1-o-マレイン酸)を使用し、それぞれ以下の組成の試薬を用いて測定を行った。

【0082】(実施例9)

1) 試薬1

0.07% コール酸Na, 5U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ, 3.0mm 4-アミノアンチピリン, 1.50mM NaCl, 30mm MOPS pH7

2) 試薬2

0.07% コール酸Na, 0.05% ポリ(1-オクタデセン-1-o-マレイン酸)、2.4U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールエスター、3.0U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ, 5.7U/ml パーオキシダーゼ, 1.5mm TOOS, 150mM NaCl, 30mm MOPS pH7

3) 試薬3

0.27% (ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル(花王株式会社製エマルゲン104P), 150mm NaCl, 30mm MOPS pH7

【0083】(実施例10)

1) 試薬1

0.07% コール酸Na、0.033% ポリ(1-オクタデセン-1-o-マレイン酸)、1.6U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールエスター、2.0U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ, 200U/ml カタラーゼ、3U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ, 1mM TOOS, 150mM NaCl, 30mM

MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 04M Na₃、0. 27% エマルゲン104
 P、3. 8U/ml パーオキシダーゼ、1. 0mM 4-アミノアンチピリン、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0084】(実施例11)

1) 試薬1

0. 07% コール酸Na、0. 033% ポリ(1-オクタデセン-コ-マレイン酸)、1. 6U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールエステラーゼ、2. 0U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、3. 8U/ml パーオキシダーゼ、2. 4mM 4-アミノアンチピリン、150mM NaCl、5U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ、30mM MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 27% エマルゲン104P、1mM TOOS、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0085】(実施例12)

1) 試薬1

0. 2% SB3-14、0. 07% ポリ(1-オクタデセン-コ-マレイン酸)、2U/ml 脾臓由来のコレステロールエステラーゼ、1U/ml Streptomyces属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、5U/ml パーオキシダーゼ、3mM 4-アミノアンチピリン、150mM NaCl、5U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ、30mM MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 2% エマルゲン104P、1mM TOOS、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0086】(実施例13)

1) 試薬1

0. 05% コール酸Na、0. 05% ポリ(1-オクタデセン-コ-マレイン酸)、0. 9U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールエステラーゼ、3. 0U/ml 微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、10U/ml パーオキシダーゼ、3. 0mM 4-アミノアンチピリン、1mM TOOS、5U/ml *

* 1 アスコルビン酸オキシダーゼ、150mM NaC

I、30mM MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 2% エマルゲン104P、2. 4% ノニデットP-40、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0087】(実施例14)

1) 試薬1

0. 05% コール酸Na、0. 05% ポリ(1-オクタデセン-コ-マレイン酸)、0. 75U/ml Pseudomonas属微生物由来のコレステロールエステラーゼ、3. 0U/ml 微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、200U/ml カタラーゼ、1mM TCOOS、5U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 04M Na₃、0. 2% エマルゲン104P、2. 4% ノニデットP-40、10U/ml パーオキシダーゼ、3. 0mM 4-アミノアンチピリン、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0088】(実施例15)

1) 試薬1

0. 2% CHAPS、3U/ml アスコルビン酸オキシダーゼ、5U/ml パーオキシダーゼ、2mM 4-アミノアンチピリン、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

2) 試薬2

0. 2% CHAPS、0. 035% ポリ(1-オクタデセン-コ-マレイン酸)、2U/ml 脾臓由来のコレステロールエステラーゼ、2U/ml 微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、1mM TOOS、150mM NaCl、30mM MOPS pH 7

【0089】実施例9~15の測定項目、供試検体量、試薬添加量を表5にまとめて示す。表中のHDL+LDL、HDL-C、LDL-Cは、それぞれ、HDLコレステロールおよびLDLコレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロールを意味する。

【0090】

【表5】

実施例	測定項目	検体量(ul)	試薬1量(ul)	試薬2量(ul)	試薬3量(ul)
9	HDL+LDL	4	100	200	100
10	LDL-C	4	300	100	-
11	LDL-C	4	300	100	-
12	LDL-C	3	300	100	-
13	LDL-C	3	300	100	-
14	LDL-C	3	300	100	-
15	HDL-C	3	300	100	-

【0091】対照法として、実施例3と同様に反応液体 50 クロマトグラフィー(HPLC)で同一血清試料のHDL

LコレステロールおよびLDLコレステロールを定量した。結果を図1ないし8に示す。

【0092】本発明によるHDLコレステロールおよびLDLコレステロール量は、反応液体クロマトグラフィー(HPLC)によるHDLコレステロールおよびLDLコレステロール量とよい相関関係を示した。

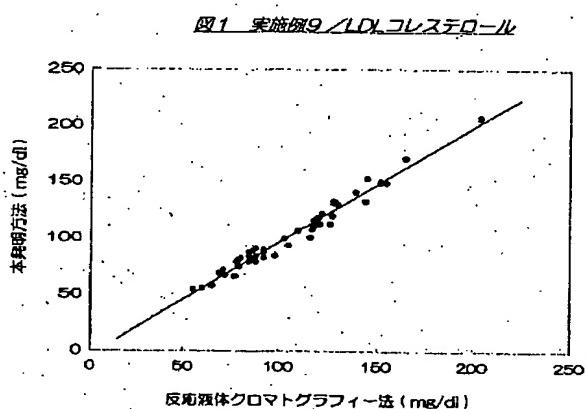
【0093】

【図面の簡単な説明】

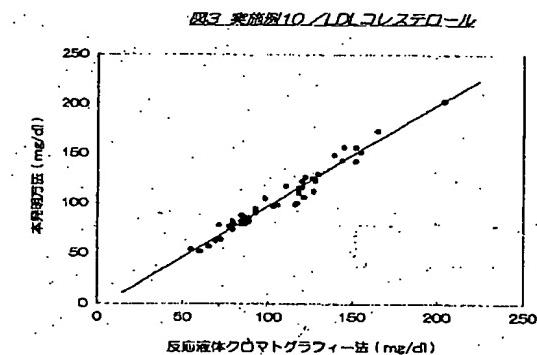
【図1】本発明実施例9のLDLコレステロールの測定値とHPLC値との相関関係を示す図である。

【図2】本発明実施例9のHDLコレステロールの測定値とHPLC値との相関関係を示す図である。

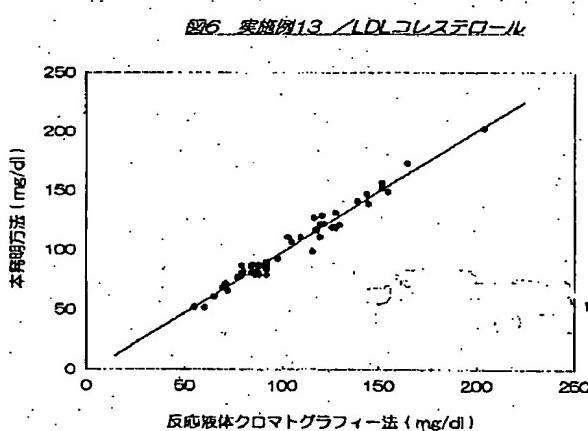
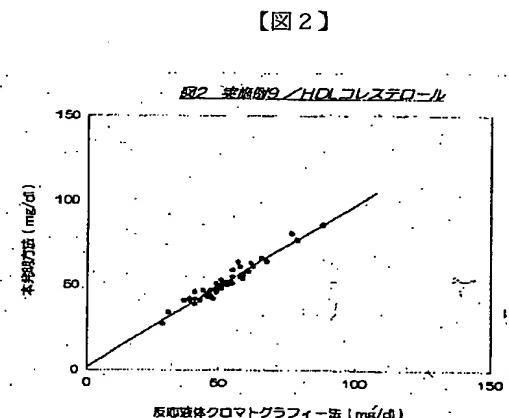
【図1】



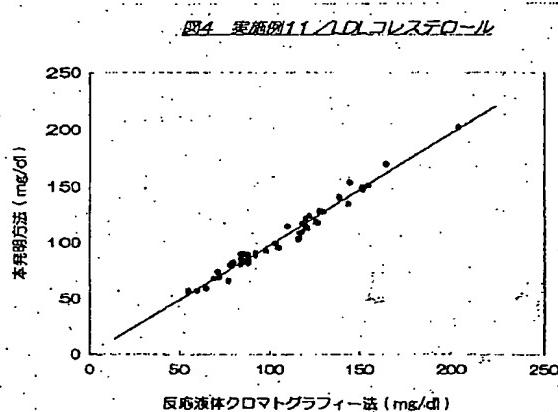
【図3】



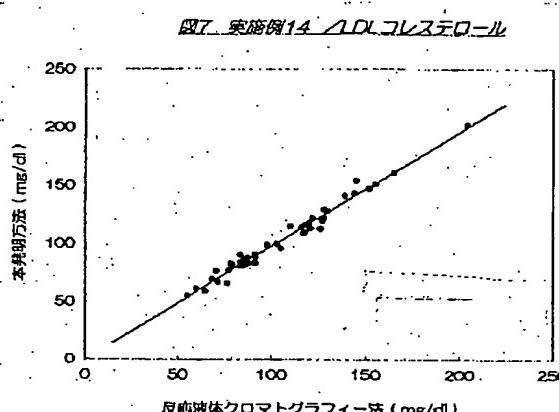
【図6】



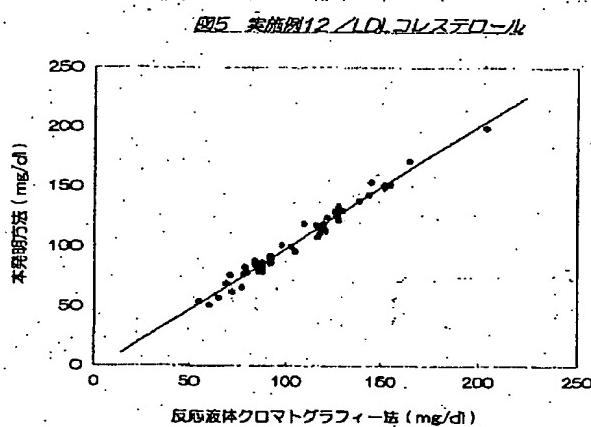
【図4】



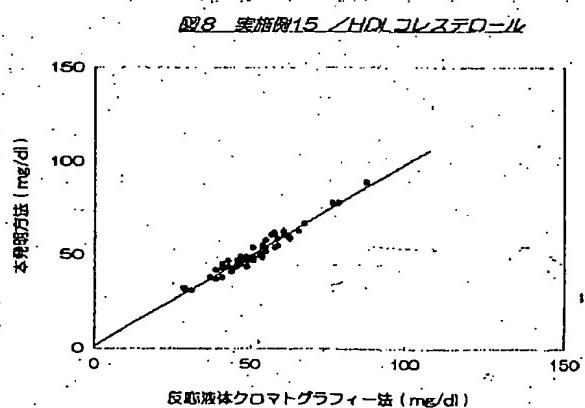
【図7】



【図5】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)
C 1 2 Q	1/28	C 1 2 Q	1/28
	1/32		1/32
	1/46		1/46
	1/60		1/60

(72)発明者 佐藤 元
神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和
電工株式会社総合研究所川崎研究室内

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA25 BB29 CA25 DA62
DA63 DA64 DA69 FA29 FB01
GC10
4B050 CC08 DD02 KK20 LL03
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ76 QR02
QR03 QR04 QR12 QR52 QS12
QX01